

**HEMMUNG DER GLUKONEOGENESE
IN ISOLIERTEN NIERENTUBULI
DURCH AMINOPHENOLE
UND EINIGE ANDERE PHARMAKA**

Wilhelm Schneiderhan

1975

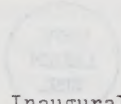


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0068

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. M. Kiese

HEMMUNG DER GLUKONEOGENESE
IN ISOLIERTEN NIERENTUBULI
DURCH AMINOPHENOLE
UND EINIGE ANDERE PHARMAKA



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wilhelm Schneiderhan
aus
Biberach a.d.Riß

München 1975



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. N. Weger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 1975

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

=====

	Seite
I Einleitung	1
II Methodik	4
1) Herstellung der Inkubationslösung	4
2) Isolierung der Nierentubuli	5
3) Inkubation isolierter Nierentubuli mit Pharmaka	7
4) Zugabe der Pharmaka zum Versuchsansatz	8
5) Glukosebestimmung	11
a) Prinzip	11
b) Ausführung	11
c) Einfluß der untersuchten Pharmaka auf die Glukosebestimmung	13
6) Bestimmung des Nierentubuli-Proteins	16
7) Auswertung der Ergebnisse	17
III Ergebnisse	18
1) Glukosebildung isolierter Nierentubuli	18
2) Wirkung des 4-Dimethylaminophenol	20
a) Abhängigkeit der Glukosebildung von der Konzentration des 4-Dimethyl- aminophenol bei gleichzeitiger Zugabe von 4-Dimethylaminophenol und Pyruvat	20
b) Glukosebildung aus Pyruvat nach Inku- bation der Tubuli mit 4-Dimethylamino- phenol	24
c) Einfluß von Glutathion auf die Hemm- wirkung von 4-Dimethylaminophenol	27

Inhaltsübersicht, Forts.

	Seite
3) Wirkung des 4-Aminophenol	29
a) Abhängigkeit der Glukosebildung von der Konzentration des 4-Amino- phenol bei gleichzeitiger Zugabe von 4-Aminophenol und Pyruvat	29
b) Glukosebildung während der Inkubation der Tubuli mit 4-Aminophenol und Pyruvat	31
c) Einfluß von Glutathion auf die Hemm- wirkung von 4-Aminophenol	33
4) Wirkung des Phenacetin	35
5) Wirkung des Paracetamol	35
6) Wirkung des Cyanid	37
7) Wirkung der Alkylphosphate	37
a) Wirkung des Tabun	37
b) Wirkung des Sarin	39
IV Diskussion	41
V Zusammenfassung	53
VI Literaturverzeichnis	55
Lebenslauf	64

I. E I N L E I T U N G =====

4-Dimethylaminophenol vermag in vitro und in vivo schnell dosisabhängige Ferrihämoglobinkonzentrationen zu bilden, wobei nur geringe Nebenwirkungen auftreten. 4-Dimethylaminophenol erscheint deshalb zur Behandlung von Cyanidvergiftungen beim Menschen geeignet (KIESE u. WEGER, 1969).

Verabreicht man Ratten intravenös subletale Dosen von 4-Dimethylaminophenol, so treten innerhalb von 24 Stunden isolierte Nekrosen der proximalen Tubuli contorti der Nieren auf (KIESE, SZINICZ, WEGER u. THIEL, 1974 in Vorber.). Die für die Nekrosebildung erforderlichen Dosen liegen weit über der zur Behandlung einer Cyanidvergiftung erforderlichen Dosis.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 4-Dimethylaminophenol auch in vitro Nierengewebe zu schädigen vermag.

Für die in-vitro-Versuche wurden isolierte Nierentubuli verwendet, die aus dem Nierenrindengewebe hungriger Ratten durch Auflösung des interstitiellen Bindegewebes mit Kollagenase präpariert wurden (GUDER u. WIELAND, 1971). Isolierte Nierentubuli haben gegenüber Nierengewebeschnitten den Vorteil, daß sie als Suspensionen pipettierbar sind. Mit ihnen können deshalb größere Versuchsserien rasch durchgeführt werden.

Die Niere vermag aus Laktat, Pyruvat, Aminosäuren und Zwischenprodukten des Citratzyklus Glukose zu bilden. Da nur intakte Zellen Glukose aufzubauen vermögen, kann die Glukoneogenese der Nierenzelle in vitro nur an Nierenschnitten (KREBS, BENNETT, de GASQUET, GASCOYNE u. YOSHIDA, 1963) und isolierten Nierentubuli (GUDER u. WIELAND, 1971) untersucht werden, jedoch nicht an Zellfraktionen und Homogenaten. Als energieverbrauchende Reaktion hängt die Glukoneogenese vom Funktionieren der Atmungskette ab. Zur Synthese von 1 Mol Glukose aus Pyruvat werden 6 Mol ATP benötigt. Deshalb beeinflussen Veränderungen in der Energieversorgung der Zelle die Glukosebildung. Die während eines Versuchs gebildete Glukose kann leicht gemessen werden, da die Niere kaum Glykogen speichert.

Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde der Einfluß von 4-Dimethylaminophenol, 4-Aminophenol, Phenacetin, Tabun (Dimethylamido-cyan-phosphorsäureäthylester), Sarin (Methylphosphonsäure-fluor-isopropylester) und Cyanid auf die Glukoneogenese isolierter Nierentubuli untersucht. Als Substrat wurde Pyruvat in der Sättigungskonzentration (10 mM) verwendet (GUDER, STUKOWSKI, WIESNER u. WIELAND, 1972).

4-Aminophenol ist wie 4-Dimethylaminophenol ein Ferrihämoglobinbildner, der ebenfalls Nekrosen der Nierentubuli verursacht (CALDER, FUNDER, GREEN, HAM u. TANGE, 1971).

Phenacetin verursacht nach jahrelanger Einnahme hoher Dosen beim Menschen wahrscheinlich eine interstitielle Nephritis, die sogenannte "Phenacetinniere" (ZOLLINGER, 1955; MÖSCHLIN, 1957; GLOOR, 1962; RAAFLAUB u. DUBACH, 1972). Da meist Kombinationspräparate verschiedener Analgetika verwendet werden, sind von englischen und australischen Forschern Zweifel daran geäußert worden, daß Phenacetin allein die beobachteten Nierenschäden verursacht (SHELLEY, 1967; ABEL, 1971).

Paracetamol, der Hauptmetabolit des Phenacetin wird ebenfalls als Analgetikum verwendet. Bei akuten Vergiftungen verursacht es Lebernekrosen und auch vereinzelt Nierenschäden (BOYER u. ROUFF, 1971; DIXON, NIMMO u. PRESCOTT, 1971; PRESCOTT, WRIGHT, ROSCOE u. BROWN, 1971).

Tabun (Dimethylamido-cyan-phosphorsäureäthylester) und Sarin (Methylphosphonsäure-fluor-isopropylester) sind Alkylphosphate. Ihre starke Toxizität beruht im wesentlichen auf einer Cholinesterasehemmwirkung, die zu einer Acetylcholinvergiftung des Körpers führt (KOELE, 1963; STADE, 1964). Der Tod tritt infolge Lungenödem und zentraler wie peripherer Atemlähmung ein. Organparenchymschäden nach Vergiftungen mit Organophosphaten werden auf Ischämie und Hypoxie zurückgeführt (DOMSCHKE u. DOMSCHKE, 1972). In diesen Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die beiden Gifte eine Wirkung auf die Glukoneogenese der Nierenzellen haben. Da Tabun im Molekül eine Cyanidgruppe enthält, wurde die Wirkung des Cyanid mit der des Tabuns verglichen.

II. M E T H O D I K

=====

1) Herstellung der Inkubationslösung

Als Inkubationsmedium wurde die von KREBS u. HENSELEIT (1932) angegebene physiologische Salzlösung verwendet (Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer). Ihre Elektrolytzusammensetzung kommt der des Säugetierserums sehr nahe. Die organischen Anionen des Serums sind durch eine etwas höhere Chloridkonzentration ersetzt. Durch Begasen mit einem Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxyd (Carbogen) stellt sich die Pufferlösung auf pH 7,4 ein.

Zur Herstellung der Lösung werden folgende Stammlösungen verwendet:

1. 0,9 % NaCl-Lösung
2. 1,15 % KCl-Lösung
3. 1,67 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung
4. 2,11 % KH_2PO_4 -Lösung
5. 3,82 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung
6. 1,3 % NaHCO_3 -Lösung (mit CO_2 durchgast)
7. Gasgemisch mit 5 Vol.-% CO_2 und 95 Vol.-% O_2

Aus den Stammlösungen stellt man für jeden Versuch die Mischung neu her. Man nimmt:

100 Teile Lösung	1
4 Teile Lösung	2
3 Teile Lösung	3
1 Teil Lösung	4
1 Teil Lösung	5
21 Teile Lösung	6

und begast die Mischung 10 min mit dem Gasgemisch 7.

2) Isolierung der Nierentubuli

Prinzip:

Isolierte Nierentubuli wurden nach der Methode von GUDER u. WIELAND (1971) aus Rattennieren hergestellt. Nach mechanischer Zerkleinerung des Nierenrindengewebes erfolgt eine enzymatische Behandlung mit Rohkollagenase. Hierdurch werden die Nierentubuli aus dem Gewebeverband herausgelöst. Die Abtrennung der isolierten Nierentubuli geschieht durch niedertouriges Zentrifugieren.

Ausführung:

Für jeden Ansatz wurden sechs 200 - 300 g schwere Albinoratten beiderlei Geschlechts verwendet, denen 24 Stunden zuvor das Futter entzogen worden war.

In leichter Äthernarkose wurden die Nieren in situ mit eiskaltem Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer perfundiert. Die blutfreien Nieren wurden entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in eiskaltem Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer gelegt. Nach Entkapselung und Halbierung der Nieren wurde das Nierenmark entfernt. Die Nierenrindenstücke wurden mit einem Pistill durch ein handelsübliches Plastikteesieb mit einer Porenweite von 0,5 mm gepreßt. Der entstandene Brei wurde in einem Becher mit eiskalter Pufferlösung aufgefangen, gewogen (5 - 7 g), gewaschen (durch Abgießen des Überstandes nach dem Sedimentieren und erneutes Aufschwemmen) und in einem Volumen von 10 ml/g Brei in Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer suspendiert. Hierzu wurden 10 mg Rohkollagenase/g Brei gegeben. (Collagenase 140 - 200 U/mg, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey). Die Suspension wurde auf zwei 250 ml Plastikschaubflaschen verteilt. Vor dem Verschließen der Flaschen wurde eine Minute lang kräftig mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Dann erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 37°C im Schüttelthermostaten unter heftigem Schütteln in der Längsrichtung. Erforderlich ist eine Schüttelfrequenz von 200/min bei einer Amplitude von 5 cm (W. GUDER, pers. Mitt. 1973).

Da das verwendete Gerät nicht schnell genug schüttelte (140/min), wurde alle 10 min 1 min lang von Hand geschüttelt. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Inkubat durch Zugabe eines gleich großen Volumens eiskalten Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers abgekühlt. Um gröbere Partikel abzutrennen wurde dreimal nach 20 Sekunden langem Sedimentieren der Überstand mit den Nierentubuli vorsichtig abgossen. Der Überstand wurde 30 Sekunden mit 10 x g zentrifugiert. Das Sediment, das die Nierentubuli enthält, wurde durch Aufschwemmen, Zentrifugieren mit 10 x g und Abgießen des Überstandes dreimal gewaschen und zuletzt in einem Volumen von 6 ml suspendiert. Diese Suspension enthielt neben isolierten Nierentubuli nur noch wenige Verunreinigungen.

3) Inkubation der isolierten Nierentubuli mit Pharmaka

Die Inkubation erfolgte in 20-ml Plastikschraubgefäßen bei 37°C im Schüttelthermostaten unter leichtem Schütteln. In jedem Gefäß wurden neben dem Pharmakon in beschriebener Konzentration 0,1 ml der Suspension isolierter Nierentubuli mit 10 mM Na-Pyruvat in Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung unter Carbogen als Gasphase bei pH 7,4 inkubiert. Das Volumen des Ansatzes betrug 1 ml. Bis zum Beginn der Inkubation standen die Gefäße im Eisbad. Beendet wurde die Inkubation durch Zufügen von 0,1 ml 3 n Perchlorsäure.

Durch Zugabe von festem KHCO_3 wurde der Ansatz wieder neutralisiert. Nach dem Zentrifugieren wurde in dem neutralen Überstand der Glukosegehalt bestimmt.

4) Zugabe der Pharmaka zum Versuchsansatz

a) Tabun und Sarin:

Für die Versuche mit diesen beiden Substanzen wurden Stammlösungen in Isopropanol verwendet. Diese wurden unmittelbar vor Gebrauch 1 : 10 mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung verdünnt. Von diesen verdünnten Lösungen wurden jeweils 0,1 ml etwa 2 - 5 min vor Inkubationsbeginn in die Inkubationsgefäße gegeben. In allen Ansätzen einschließlich der Kontrollansätze war 1 % Iso-propanol enthalten. Die Inkubationszeit betrug 60 min.

b) Cyanid:

Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 10 mM KCN-Lösung in Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung hergestellt, die mit HCl auf pH 7,4 eingestellt wurde. Von den Verdünnungen wurden jeweils 0,1 ml etwa 2 - 5 min vor Inkubationsbeginn in die Inkubationsgefäße gegeben. Die Inkubationszeit betrug 60 min.

c) Paracetamol:

Für jeden Versuch wurde eine 20,6 mM Paracetamol-Lösung in Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung frisch hergestellt. Da die Substanz schwer wasserlöslich ist, wurde das Auflösen durch Inkubation bei 37°C beschleunigt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 0,8 ml etwa 2 - 5 min vor Inkubationsbeginn in die Inkubationsgefäße gegeben. Die Inkubationszeit betrug 60 min.

d) Phenacetin:

Da Phenacetin schlecht wasserlöslich ist, wurde es in Methanol gelöst. Entsprechende Volumina einer 55,8 mM Phenacetinlösung in Methanol wurden zuerst in die Inkubationsgefäße pipettiert. Nach dem Verdunsten des Methanols wurden die übrigen Bestandteile des Ansatzes mit 1 ml Gesamtvolumen zupipettiert. Nach Erwärmen auf 37°C löste sich der Phenacetinniederschlag rasch auf. Die Inkubationszeit betrug 60 min.

e) 4-Dimethylaminophenol-Hydrochlorid (4-DMAP):

Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 1,15 mM 4-DMAP-Lösung in Aqua dest. hergestellt. (In diesem sauren Milieu ist 4-DMAP relativ beständig.) Verdünnungen wurden ebenfalls in Aqua dest. hergestellt. Von diesen wurden jeweils 50 µl in die Inkubationsgefäße pipettiert. Bei den Versuchen mit einer Inkubationszeit von 80 min mit 10 mM Pyruvat als Substrat geschah dies etwa 3 - 5 min vor Inkubationsbeginn.

Bei den Versuchen mit Vorinkubation der Nierentubuli mit 4-DMAP (ohne Substrat) wurden die 4-DMAP-Lösungen unmittelbar vor Inkubationsbeginn zugesetzt. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wurden die Inkubationsgefäße zur Zugabe von 10 mM Pyruvat geöffnet und erneut mit Carbogen begast. Die Inkubationszeiten mit dem Substrat betrugen hier 10 und 20 min.

f) 4-Aminophenol-Hydrochlorid (4-AP):

Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 13,7 mM 4-AP-Lösung in Aqua dest. hergestellt. Verdünnungen wurden ebenfalls in Aqua dest. zubereitet. Von den Verdünnungen wurden jeweils 50 µl etwa 3 - 5 min vor Inkubationsbeginn in die Inkubationsgefäße gegeben. Die Inkubationszeit betrug 60 min.

5) Glukosebestimmung

a) Prinzip:

Die Glukose wird in einer durch Hexokinase katalysierten enzymatischen Reaktion durch ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Glukose-6-Phosphat wird in Anwesenheit von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und NADP oxydiert, wobei in äquimolaren Mengen NADPH gebildet wird. NADPH ist aufgrund seiner Absorption zwischen 334 und 366 nm leicht photometrisch zu messen (BERGMEYER, 1970).

b) Ausführung:

In Küvetten mit 1 cm Schichtdicke wurden 500 μ l Reagenzlösung und 50 μ l enteiweißte Probenlösung (Versuche mit 60 und 80 min Inkubationszeit) bzw. 300 μ l Reagenzlösung und 200 μ l Probenlösung (Versuche mit 10 und 20 min Inkubationszeit) pipettiert. In der Küvette lagen folgende Konzentrationen vor: 0,25 M Triäthanolamin pH 7,5; 3,5 mM Mg SO_4 ; 0,4 mM NADP; 0,5 mM ATP. Nach Messung der Anfangsextinktion bei 340 nm gegen Luft als Leerwert wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l eines Enzymgemisches aus 1 mg/ml Hexokinase und 1 mg/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase gestartet. Die Reaktion war bei Zimmertemperatur in etwa 5 min vollständig abgelaufen. Die Extinktionszunahme durch die NADPH-Bildung (ΔE) ist die Differenz aus Endextinktion (E_2) und Anfangsextinktion (E_1) minus der Extinktionszunahme durch die

Enzymzugabe (E_e)

$$\Delta E = E_2 - E_1 - E_e$$

Für die in der Probenlösung enthaltene Glukose (G) gilt:

$$G = \frac{1}{d \cdot \epsilon_{340}} \cdot \frac{V}{v} \cdot F \cdot \Delta E \left[\frac{\mu\text{M Glukose}}{\text{ml}} \right]$$

V ist das Gesamtvolumen in der Küvette ($V=560$
bzw. $510\mu\text{l}$)

v ist das Volumen der enteiweißten Proben-
lösung ($v=50$ bzw. $200\mu\text{l}$)

d ist die Schichtdicke der Küvette ($d=1\text{ cm}$)

F ist der Verdünnungsfaktor für die Ent-
eiweißung ($F = 1,1$)

ϵ_{340} ist der mikromolare Extinktionskoeffizient
für NADPH bei 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22\text{ cm}^2/\text{Mol}$).

Für $50\mu\text{l}$ enteiweißte Probenlösung in $560\mu\text{l}$
Gesamtvolumen ergibt sich

$$G = 1,98 \cdot \Delta E \left[\mu\text{Mol Glukose}/1\text{ ml Ansatz} \right]$$

Für $200\mu\text{l}$ enteiweißte Probenlösung in $510\mu\text{l}$
Gesamtvolumen ergibt sich

$$G = 0,451 \cdot \Delta E \left[\mu\text{Mol Glukose}/1\text{ ml Ansatz} \right].$$

c) Einfluß der untersuchten Pharmaka auf die Glukose-
bestimmung: - - - - -

Die Glukosebestimmung nach der Hexokinase-Glukose-6-Phosphat-Methode wurde durch die in den Probenlösungen enthaltenen Pharmaka nicht gestört. Dies wurde wie folgt geprüft:

- 1) In einer 505 μM Glukoselösung wurde jeweils ein Pharmakon in der höchsten verwendeten Konzentration gelöst. Die Glukosebestimmung erfolgte dann in der beschriebenen Weise mit 50 μl Probenlösung. Die Mittelwerte der Ergebnisse liegen alle im Streubereich des Kontrollwertes (doppelte Standardabweichung) (Tab.1).
- 2) Zunächst wurde in zwei Küvetten parallel mit 50 bzw. 200 μl enteweißter pharmakonhaltiger Inkubationslösung der Glukosegehalt gemessen. Anschließend wurde in eine der beiden Küvetten 50 μl 505 μM Glukoselösung und in die andere 50 μl H_2O (Leerwert) pipettiert. Nach etwa 5 min war die Reaktion vollständig abgelaufen. Die Konzentration der Glukoselösung wurde aus der Extinktionsdifferenz beider Küvetten errechnet. Die Mittelwerte der Ergebnisse liegen alle im Streubereich des Kontrollwertes (doppelte Standardabweichung) (Tab.2).

Konzentration des Pharmakon i.d.Glukoselösg.	gemessene Glukose	
ohne Pharmakon	478,5 $\mu\text{M} \pm 7,0(\text{s})$	(11)
1mM KCN	476 μM	(3)
0,668 mM Tabun	477 μM	(5)
7.8 mM Sarin	473 μM	(3)
0,57 mM 4-DMAP	488 μM	(4)

Tab.1 Glukosebestimmung:

Einfluß der untersuchten Pharmaka auf die Glukosebestimmung. Die Pharmaka wurden einer Glukoselösung in der angegebenen Konzentration zugesetzt. Die Glukosebestimmung erfolgte nach der Hexokinase-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode. Die angegebenen Glukosewerte sind Mittel aus der in Klammern angegebenen Anzahl von Wiederholungen. Beim Kontrollwert ohne Pharmakon ist die Standardabweichung (s) angegeben.

Konzentration des Pharmakon in der Inkubationslösung	gemessene Glukose
a) 50 μ l Inkubationslösung in 610 μ l Ansatz in der Küvette	
ohne Pharmakon	489 μ M (2)
23 μ M 4-DMAP	493 μ M (2)
1 mM red.Glutathion (GSH)	495 μ M (3)
57 μ M 4-DMAP und 1 mM GSH	490 μ M (2)
0,48 mM 4-AP	487 μ M (3)
0,69mM 4-AP und 1mM GSH	485 μ M (2)
5,5mM Phenacetin	471 μ M (4)
13mM Paracetamol	479 μ M (3)
b) 200 μ l Inkubationslösung in 560 μ l Ansatz in der Küvette	
ohne Pharmakon	490 μ M (5)
17,3 μ M 4-DMAP	481 μ M (6)

Tab.2 Glukosebestimmung:

Einfluß der untersuchten Pharmaka auf die
Glukosebestimmung nach der Hexokinase-
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode.

In der Küvette waren, neben der pharmakon-
haltigen enteileiweißten Inkubationslösung aus
den Versuchen mit isolierten Nierentubuli,
50 μ l Glukoselösung enthalten. Die angege-
benen Glukosewerte sind Mittel aus der in
Klammern angegebenen Anzahl von Wiederho-
lungen. Sie betreffen die zugesetzte Glu-
koselösung.

6) Bestimmung des Nierentubuli-Proteins

a) Prinzip:

Der Proteingehalt der Inkubationslösungen mit den Nierentubuli wurde nach einer modifizierten Biuretmethode bestimmt (L. WEISS unveröffentlicht). In alkalischer Lösung bilden Proteine mit Kupferionen den gefärbten Biuretkomplex, der bei 546 nm photometrisch bestimmt werden kann. In den Tubuli enthaltene Lipide, die Trübungen verursachen, werden mit Dioxan extrahiert.

b) Ausführung:

In ein Mikrolitergefäß (Fa. Netheler) wird zu 50 μ l Nierentubulisuspension 1 ml Dioxan pipettiert. Nach Schütteln von 5 min wird zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen. Zum Sediment pipettiert man 1 ml 0,3 n Trichloressigsäure. Dann folgen nochmals 5 min Schütteln, Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes. Zuletzt wird zum Sediment 1 ml Biuretreagenz gegeben und 30 min geschüttelt, damit sich der Niederschlag auflöst. Die Extinktion der Lösung wird im Photometer bei 546 nm gegen Biuretreagenz als Leerwert bestimmt. Als Standard wurde eine Albuminlösung verwendet (Fa. Boehringer, Mannheim).

7) Auswertung der Ergebnisse

Mit jeder Tubulipräparation wurden die betreffenden Inkubationsversuche 3 - 4 mal wiederholt. Die erhaltenen Meßwerte wurden im Mittelwert zusammengefaßt. Zudem wurden die betreffenden Versuche mit 4 - 6 verschiedenen Tubulipräparationen wiederholt. Aus den Wiederholungen mit verschiedenen Tubulipräparationen wurden Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte errechnet. Die von den Nierentubuli gebildete Glukose wurde auf 1mg Protein und auf 1 Stunde Inkubationszeit bezogen. In der Inkubationslösung war zwischen 0,7 und 1,5 mg Protein/ml enthalten. (Nach GUDER, WIESNER, STUKOWSKI u. WIELAND (1971) entspricht 1 mg Gewebeprotein 1,28 mg Gewebetrockengewicht. Bei einem Wassergehalt von 80 % entspricht dies 6,4 mg Gewebefeuchtgewicht.)

III. E R G E B N I S S E

=====

1. Glukosebildung isolierter Rattennierentubuli

In Abbildung 1 ist die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus 10 mM Pyruvat während einer Inkubationszeit von 140 min dargestellt. Bis zu einer Inkubationszeit von 40 min verlief die Glukosebildung linear; in 20 min wurden etwa 150 nMol Glukose pro Ansatz gebildet und in 40 min 300 nMol pro Ansatz. Bei Inkubationszeiten über 40 min nahm die Geschwindigkeit der Glukosebildung allmählich ab; nach 60 min waren etwa 400 nMol und nach 80 min etwa 500 nMol Glukose pro Ansatz gebildet. Bei Inkubationszeiten von mehr als 80 min nahm die Geschwindigkeit der Glukosebildung deutlich ab; in 100 min wurden etwa 570 nMol, in 120 min etwa 640 nMol und in 140 min etwa 700 nMol Glukose pro Ansatz gebildet. (Bei dem hier beschriebenen Versuch hatte der Ansatz ein Volumen von 1 ml. Im Versuchsansatz waren 1,2 bzw. 1,3 mg Protein enthalten.)

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen betrug die in den Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat gebildete Glukose 389 nMol pro 60 min pro mg Protein (± 9 nMol/60 min/mg Protein mittlerer Fehler des Mittelwerts, $n = 13$). GUDER, WIESNER, STUKOWSKI u. WIELAND (1971) geben hierfür 472 nMol/60 min/mg Protein an (± 50 nMol/60 min/mg Protein mittlerer Fehler des Mittelwerts, $n = 10$).

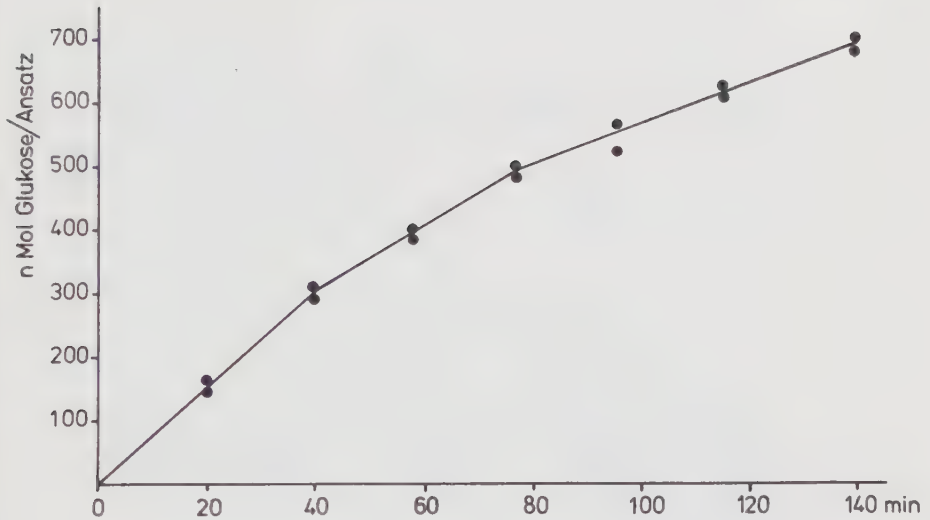


Abb. 1:

Verlauf der Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus 10 mM Pyruvat

Die Marken sind Mittelwerte aus je 3 Wiederholungen von zwei Versuchen mit verschiedenen Nierentubulizubereitungen, die 1,2 bzw. 1,3 mg Protein pro ml enthielten.

2. Wirkung des 4-Dimethylaminophenol (4-DMAP)

- a) Abhängigkeit der Glukosebildung von der Konzentration des 4-Dimethylaminophenol bei gleichzeitiger Zugabe von 4-Dimethylaminophenol und Pyruvat - -

Inkubiert man isolierte Nierentubuli 80 min mit 4-Dimethylaminophenol und Pyruvat, so kommt es ab einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol zu einer Hemmung der Glukoneogenese. In Abbildung 2 ist die Hemmwirkung von 4-Dimethylaminophenol auf die Glukosebildung von 4 verschiedenen Tubulipräparationen mit einem Proteingehalt von 0,75, 1,0, 1,1 und 1,3 mg pro ml Inkubat wiedergegeben. Bei gleicher Konzentration an 4-Dimethylaminophenol werden Tubulipräparationen mit niedrigem Proteingehalt stärker gehemmt, als solche mit einem hohen Proteingehalt. Zu 50 % gehemmt wurde die Präparation mit 0,75 mg Protein pro ml Inkubat durch $15\text{ }\mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol, die mit 1,0 mg Protein/ml durch $20\text{ }\mu\text{M}$ und die mit 1,3 mg Protein/ml durch etwa $25\text{ }\mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol. Aus Abbildung 3 ist zu entnehmen, daß sich, bei gleicher Hemmwirkung auf die Glukoneogenese der Nierentubuli, Konzentration an 4-Dimethylaminophenol und Konzentration der Nierentubuli proportional verhalten. Trägt man nämlich die Glukosewerte nicht gegen die Konzentration von 4-Dimethylaminophenol (μM) auf, sondern gegen die Dosis pro mg Protein (nMol 4-DMAP/mg Protein), so liegen die Dosis-Wirkungskurven trotz unterschiedlichen Proteingehaltes dicht beieinander.

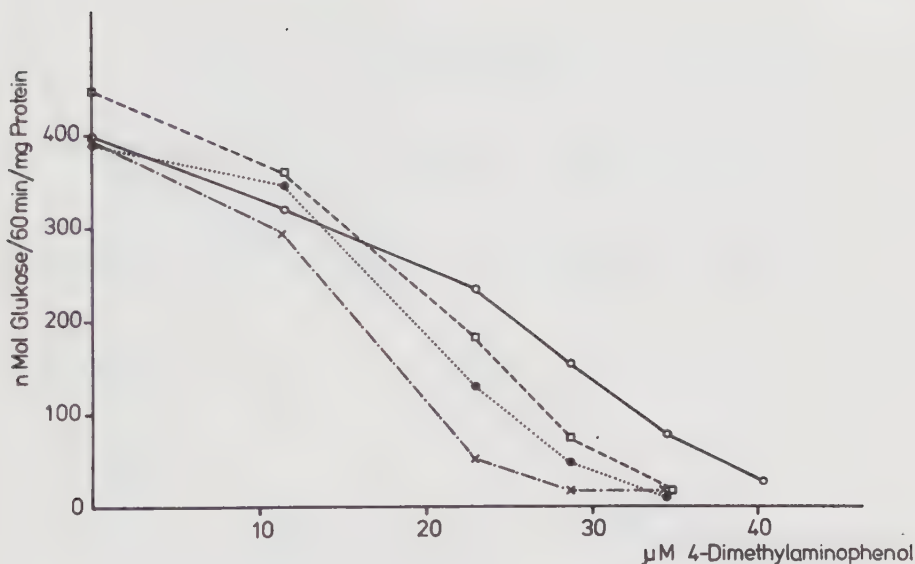


Abb. 2:

Einfluß von 4-Dimethylaminophenol auf die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung der Nierentubuli ist in Abhängigkeit von der Konzentration des 4-Dimethylaminophenol im Inkubationsansatz aufgetragen. Jede der vier Kurven stellt die Dosis-Wirkungs-Beziehung für eine bestimmte Tubulizubereitung dar. Die Marken sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen. Die Nierentubuli wurden 80 min mit 10 mM Pyruvat und 4-Dimethylaminophenol inkubiert.

Gehalt der Nierentubulizubereitungen an Protein:

- 1,3 mg Protein/ml Inkubat ● 1,0 mg Protein/ml Inkubat
 □ 1,1 mg Protein/ml Inkubat × 0,75 mg Protein/ml Inkubat

Bis zu einer Dosis von 10 nMol 4-DMAP/mg Protein tritt nur eine leichte Hemmung ein. Zwischen 10 und 30 nMol/mg fällt die Glukosebildung annähernd linear von 80 % auf 10 % vom Kontrollwert ohne 4-Dimethylaminophenol ab. 25 %-ige Hemmung der Glukosebildung wird durch etwa 12 nMol 4-DMAP/mg Protein verursacht, 50 %-ige durch 20 nMol/mg und 75 %-ige Hemmung durch etwa 25 nMol/mg Protein.

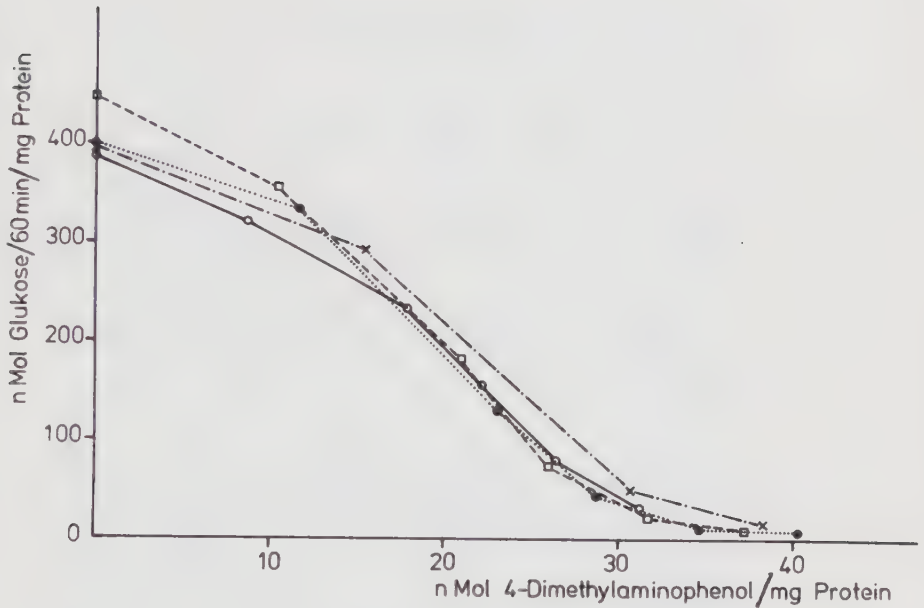


Abb.3:

Einfluß von 4-Dimethylaminophenol auf die Glukose-
bildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung der Nierentubuli ist in Abhängig-
keit von der Dosis des 4-Dimethylaminophenol pro mg
Protein aufgetragen. Es handelt sich um die selben
Versuchsergebnisse wie in Abbildung 2.

b) Glukosebildung aus Pyruvat nach Inkubation der
Tubuli mit 4-Dimethylaminophenol _ _ _ _ _

Um zu erfassen, wie sich die Glukosebildung der Nierentubuli während der Inkubation mit 4-Dimethylaminophenol ändert, wurden die Nierentubuli zunächst ohne Substrat mit 4-Dimethylaminophenol inkubiert (Vorinkubation). Nach einer Inkubationszeit bis zu 80 min mit 4-Dimethylaminophenol wurde dann 10 mM Pyruvat als Substrat zur Inkubationslösung gegeben. Während der darauffolgenden 20 min wurde die Glukosebildung der Nierentubuli aus Pyruvat bestimmt.

In Abbildung 4 ist die Glukosebildung der Nierentubuli nach Zugabe des Substrats wiedergegeben. Der Abschnitt auf der Abszisse bis zum Beginn der betreffenden Kurve stellt die Inkubationszeit der Nierentubuli ohne Substrat dar (Vorinkubationszeit). Durch die Vorinkubation verringerte sich die Glukosebildung der Nierentubuli auch im Kontrollversuch ohne 4-Dimethylaminophenol: Bei 0 min Vorinkubation wurden 170 nMol Glukose/20 min/mg Protein gebildet. Nach 40 min Vorinkubation (ohne Substrat) war die Glukosebildung aus 10 mM Pyruvat auf 150 nMol Glukose/20 min/mg Protein leicht erniedrigt und nach 80 min Vorinkubation (ohne Substrat) auf 120 nMol Glukose/20 min/mg Protein deutlich erniedrigt. Während der 20 min langen Inkubation mit Substrat war die Glukosebildung der Nierentubuli bei allen verwendeten Vorinkubationszeiten (ohne Substrat) linear.

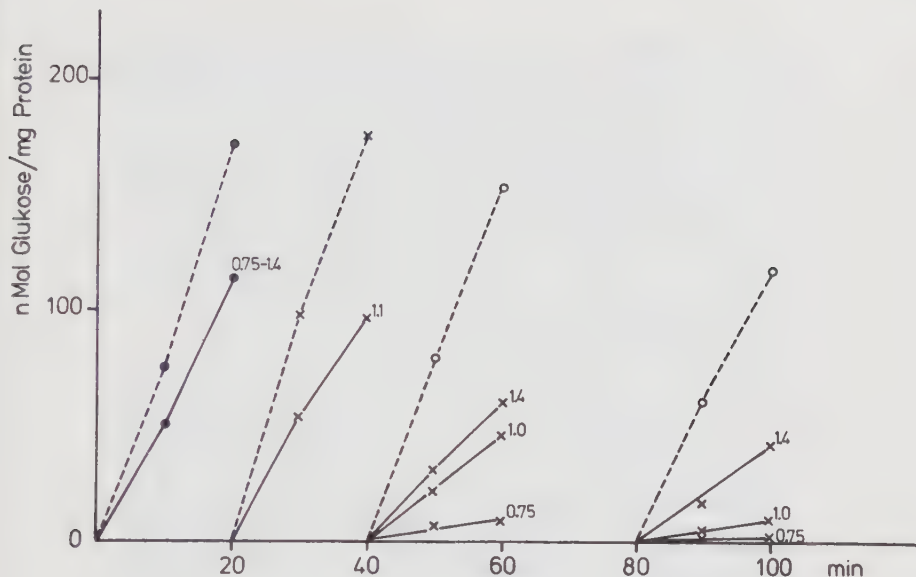


Abb.4:

Glukosebildung in isolierten Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat nach Vorinkubation der Nierentubuli mit 4-Dimethylaminophenol.

Bei 0 min wurde die Vorinkubation mit 17 μ M 4-Dimethylaminophenol begonnen. Nach 0, 20, 40 und 80 min wurde 10 mM Pyruvat als Substrat für die Glukoneogenese zugesetzt. Die Zahlen geben den Proteingehalt im Inkubationsansatz an.

- ---- ● ohne 4-Dimethylaminophenol (n = 5)
- ---- ○ ohne 4-Dimethylaminophenol (n = 3)
- ——— ● 17 μ M 4-Dimethylaminophenol (n = 5)
- X ——— X 17 μ M 4-Dimethylaminophenol (n = 1)

(n = Zahl der Versuche mit verschiedenen Nierentubulizubereitungen mit jeweils drei Wiederholungen)

Wurde zu Beginn der Vorinkubationszeit 4-Dimethylaminophenol zur Inkubationslösung gegeben, so war die Glukosebildung im Vergleich zum Kontrollversuch ohne 4-Dimethylaminophenol vermindert, und zwar um so mehr, je länger ohne Substrat inkubiert worden war. Dabei zeigte sich bei 40 und 80 min Vorinkubation (ohne Substrat) mit 4-Dimethylaminophenol, daß Tubulipräparationen mit geringem Proteingehalt stärker gehemmt wurden als solche mit einem höheren Proteingehalt.

Bei 0 min Vorinkubation (ohne Substrat) wurde die Glukosebildung aus Pyruvat durch $17 \mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol zu etwa 30 % gegenüber dem Kontrollwert gehemmt, wobei der Proteingehalt der verwendeten Tubulipräparation keine große Rolle spielte. Nach 20 min Vorinkubation (ohne Substrat) mit $17 \mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol wurde die Glukosebildung einer Tubulipräparation mit 1,1 mg Protein/ml Inkubat zu etwa 45 % gehemmt. Nach 40 bzw. 80 min Vorinkubation (ohne Substrat) mit $17 \mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol wurde die Glukosebildung aus 10 mM Pyruvat einer Tubulipräparation mit 0,75 mg Protein/ml Inkubat zu 95 bzw. 100 % gehemmt, die Glukosebildung einer Präparation mit 1 mg Protein/ml Inkubat zu 75 bzw. 90 % gehemmt und die Glukosebildung einer Präparation mit 1,4 mg Protein/ml Inkubat zu 55 bzw. 65 % gehemmt.

c) Einfluß von Glutathion auf die Hemmwirkung von
4-Dimethylaminophenol - - - - -

Setzt man der Inkubationslösung zu Beginn der Inkubationszeit außer dem 4-Dimethylaminophenol und dem Pyruvat noch reduziertes Glutathion zu, so wird die Glukosebildung der Nierentubuli wesentlich weniger gehemmt.

Wie Tabelle 3 zeigt, wird die Glukosebildung aus 10 mM Pyruvat durch 58 μ M 4-Dimethylaminophenol vollständig gehemmt. Gibt man jedoch zu Beginn der Inkubationszeit von 80 min 1 mM reduziertes Glutathion in die Inkubationslösung, so wird die Glukosebildung der Nierentubuli durch 58 μ M 4-Dimethylaminophenol gegenüber der Kontrolle ohne 4-Dimethylaminophenol nur zu etwa 40 % gehemmt.

Glutathion selbst wird in der verwendeten Konzentration nicht als Substrat für die Glukoneogenese verwendet. 1 mM reduziertes Glutathion allein steigert die Glukosebildung der Nierentubuli nicht über die Glukosebildung ohne Substrat, die von GUDER, WIESNER, STUKOWSKI u. WIELAND (1971) mit 51 nMol pro mg Protein pro 60 min $\pm$ 4 (mittlerer Fehler des Mittelwertes bei 39 Versuchen) angegeben wird.

Konzentration der Substanzen in der Inkubationslösung	Glukosebildung der isol. Nierentubuli in nMol/60min/mg Protein
1) 1 mM red. Glutathion (ohne Pyruvat)	63
2) 10 mM Pyruvat 1 mM red. Glutathion	442 ± 7
3) 58 µM 4-Dimethylaminophenol 1 mM red. Glutathion 10 mM Pyruvat	256 ± 18
4) 58 µM 4-Dimethylaminophenol 0 mM red. Glutathion 10 mM Pyruvat	0

Tab.3: Hemmwirkung von 4-Dimethylaminophenol auf die Glukosebildung in isolierten Nierentubuli unter dem Einfluß von reduziertem Glutathion.

Zu 1): Mittelwert aus zwei Versuchen mit je 3 Wiederholungen. Inkubationszeit: 60 min

Zu 2) und 3): Mittelwerte aus vier Versuchen mit je 3 Wiederholungen ± mittlerer Fehler des Mittelwerts
Inkubationszeit: 80 min.

Gehalt an Nierentubuli im Inkubat:
0,75 - 1,1 mg Protein/ml.

3. Wirkung des 4-Aminophenol (4-AP)

- a) Abhängigkeit der Glukosebildung von der Konzentration des 4-Aminophenol bei gleichzeitiger Zugabe von 4-Aminophenol und Pyruvat - - - - -

Die Hemmwirkung von 4-Aminophenol auf die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus Pyruvat ist ebenso, wie die von 4-Dimethylaminophenol vom Gehalt der Inkubationslösung an Nierentubuli abhängig. Deshalb wurde in Abbildung 5 die Glukosebildung der Nierentubuli gegen die Dosis an 4-Aminophenol pro mg Tubuliprotein aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurven für vier verschiedene Nierentubulipräparationen mit einem Proteingehalt zwischen 0,9 - 1,2 mg Protein pro ml Inkubat liegen in Abbildung 5 dicht beieinander. Dies bedeutet, daß sich bei gleicher Hemmwirkung Konzentration an Nierentubuli in der Inkubationslösung und Konzentration an 4-Aminophenol proportional verhalten. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wird die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat ab etwa 200 nMol 4-Aminophenol pro mg Protein gehemmt. Zwischen 200 und 600 nMol/mg fällt die Glukosebildung annähernd linear von 90 % auf 5 % vom Kontrollwert ab. 25 %-ige Hemmung gegenüber dem Kontrollwert ohne 4-Aminophenol erfolgt durch etwa 280 nMol 4-Aminophenol pro mg Protein, 50 %-ige Hemmung durch etwa 350 nMol/mg und 75 %-ige Hemmung durch etwa 450 nMol/mg.

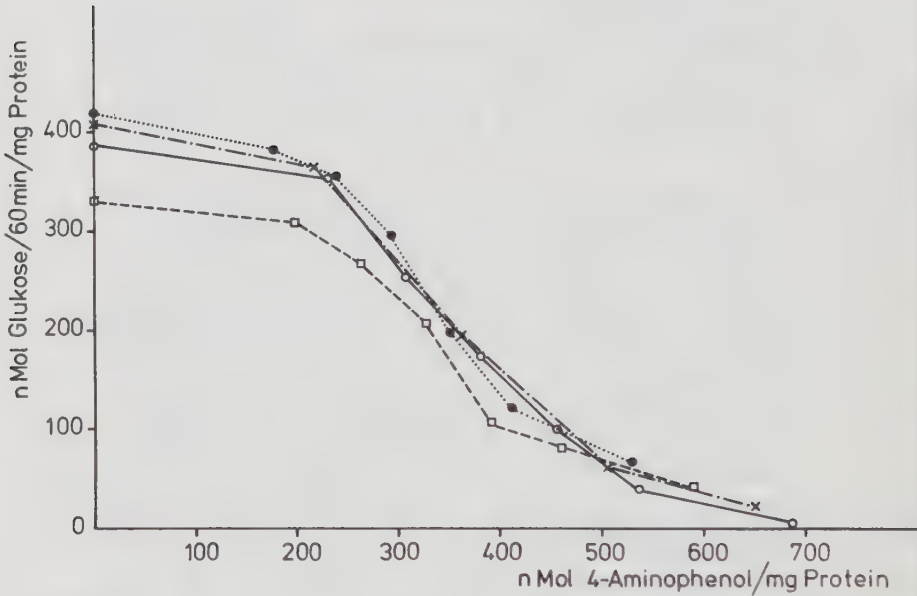


Abb.5:

Einfluß von 4-Aminophenol auf die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung ist in Abhängigkeit von der Dosis des 4-Aminophenol pro mg Nierentubuliprotein aufgetragen. Jede der vier Kurven stellt die Dosis-Wirkungs-Beziehung für eine bestimmte Nierentubulizubereitung dar, deren Gehalt an Protein zwischen 0,9 und 1,2 mg Protein/ml Inkubat lag.

Die Marken sind Mittelwerte aus 3 Wiederholungen. Die Nierentubuli wurden 60 min mit 10 mM Pyruvat und 4-Aminophenol inkubiert.

b) Glukosebildung während der Inkubation der Tubuli
mit 4-Aminophenol und Pyruvat - - - - -

In Abbildung 6 ist der Verlauf der Hemmwirkung von 4-Aminophenol auf die Glukosebildung isolierter Nierentubuli wiedergegeben. Während der Inkubationszeit von 60 min ist die Glukosebildung der Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat annähernd linear; ohne 4-Aminophenol im Inkubationsansatz wurden in 20 min 130 nMol Glukose pro mg Protein gebildet, in 40 min 260 nMol/mg und in 60 min 370 nMol/mg. War im Versuchsansatz außer Pyruvat noch 380 μ M 4-Aminophenol enthalten (bei 0,85 - 0,9 mg Protein pro ml Inkubationsansatz), so fiel die Geschwindigkeit der Glukosebildung der Nierentubuli während der Inkubationszeit stark ab. Während der ersten 20 min wurden 120 nMol Glukose pro mg Protein gebildet, also nur 10 nMol/mg weniger als ohne Zusatz von 4-Aminophenol. Während der zweiten 20 min fiel die Geschwindigkeit der Glukosebildung stark ab. Gegenüber dem Kontrollwert von 130 nMol Glukose pro mg Protein wurden in dieser Zeitspanne nur noch 45 nMol/mg gebildet. Während der darauffolgenden Zeit wurde die Glukosebildung durch 4-Aminophenol vollständig gehemmt.

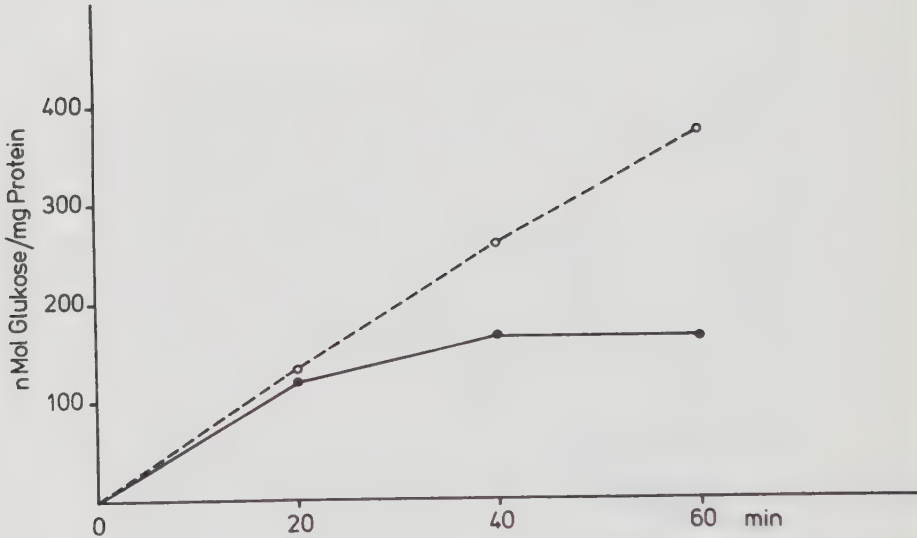


Abb. 6:

Verlauf der Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat in Anwesenheit von 4-Aminophenol.

Die Marken sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen. Zum Inkubationsansatz mit 0,85 bzw. 0,9 mg Nierentubuliprotein pro ml wurden $380\text{ }\mu\text{M}$ 4-Aminophenol und 10 mM Pyruvat zugesetzt.

○ ohne 4-Aminophenol

● $380\text{ }\mu\text{M}$ 4-Aminophenol

c) Einfluß von Glutathion auf die Wirkung des
4-Aminophenol _ _ _ _ _

Durch Zugabe von reduziertem Glutathion zur Inkubationslösung wird die Hemmwirkung von 4-Aminophenol auf die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat stark vermindert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Durch 680 μ M 4-Aminophenol wird die Glukosebildung der Nierentubuli aus Pyruvat vollständig gehemmt. Setzt man der Inkubationslösung zu Beginn der 60 min langen Inkubationszeit außer dem 4-Aminophenol noch 1mM reduziertess Glutathion zu, so wird die Glukosebildung gegenüber der Kontrolle ohne 4-Aminophenol nur zu etwa 15 % gehemmt. 1 mM Glutathion allein steigert die Glukosebildung der Nierentubuli nicht über den von GUDER, WIESNER, STUKOWSKI u. WIELAND (1971) angegebenen Wert für die Glukosebildung ohne Substrat von 51 nMol Glukose pro mg Protein pro 60 min ($\pm$ 4 nMol/mg Protein/60 min mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = 39).

Konzentration der Substanzen in der Inkubationslösung	Glukosebildung der isolierten Nieren- tubuli in nMol/60min/ mg Protein
1) 1 mM red.Glutathion (ohne Pyruvat)	63
2) 10 mM Pyruvat 1 mM red. Glutathion	458
3) 680 μ M 4-Aminophenol 1 mM red. Glutathion 10 mM Pyruvat	383
4) 680 μ M 4-Aminophenol 10 mM Pyruvat	0

Tab.4: Hemmwirkung von 4-Aminophenol auf die Glukose-
bildung in isolierten Nierentubuli unter dem
Einfluß von reduziertem Glutathion.

Die angegebenen Werte sind Mittel von zwei Ver-
suchen mit je drei Wiederholungen. Gehalt an
Nierentubuli im Inkubat: 0,85 und 0,9 mg Pro-
tein/ml

Inkubationszeit: 60 min.

4. Wirkung des Phenacetin

In Abbildung 7 ist die Hemmwirkung von Phenacetin auf die Glukosebildung der Nierentubuli aus Pyruvat bei gleichzeitiger Zugabe von Phenacetin und 10 mM Pyruvat wiedergegeben. Während einer Inkubationszeit von 60 min wird die Glukosebildung durch 1,4 mM Phenacetin zu etwa 25 % gegenüber der Kontrolle ohne Phenacetin gehemmt, durch 2,8 mM zu etwa 40 %, durch 4,2 mM zu etwa 70 % und durch 5,6 mM zu etwa 85 %. Eine 50 %-ige Hemmung wird durch etwa 3,2 mM Phenacetin in der Inkubationslösung erreicht.

5. Wirkung des Paracetamol

Die Glukosebildung der Nierentubuli wird durch Paracetamol in höheren Konzentrationen gehemmt, als durch Phenacetin. Während einer Inkubationszeit von 60 min mit 10 mM Pyruvat als Substrat und mit Paracetamol wird die Glukoneogenese, wie Abbildung 7 zeigt, ab etwa 5 mM Paracetamol gehemmt. Durch Steigerung von 5 auf 13 mM Paracetamol fällt die Glukosebildung annähernd linear von 85 % auf 13 % vom Kontrollwert ohne Paracetamol ab. 6,7 mM Paracetamol bewirken etwa 30 %-ige Hemmung, 8,3 mM etwa 45 %-ige Hemmung, 10 mM etwa 65 %-ige und 11,7 mM etwa 80 %-ige Hemmung. Eine 50 %-ige Hemmung der Glukosebildung isolierter Nierentubuli erfolgt durch etwa 9 mM Paracetamol.

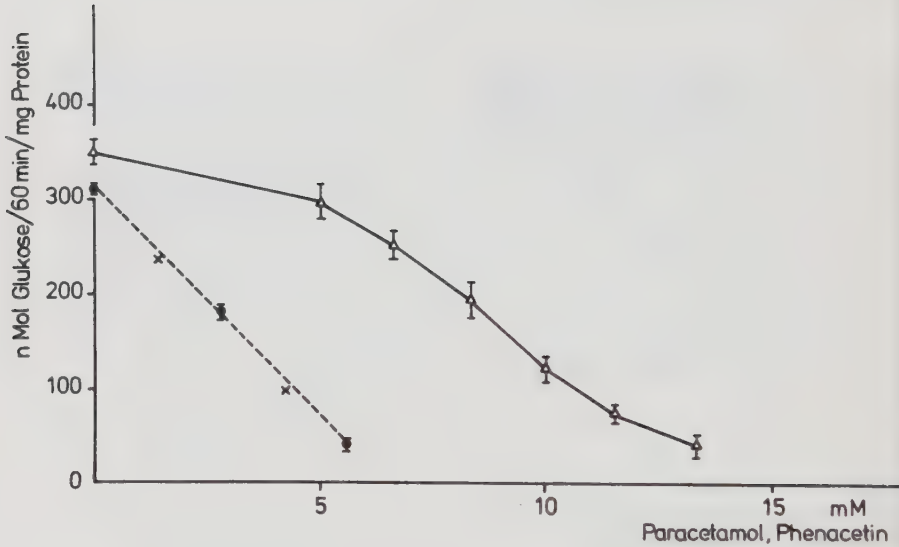


Abb.7:

Einfluß von Phenacetin und Paracetamol auf die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung ist in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden Substanzen im Inkubationsansatz aufgetragen. Die Nierentubuli wurden 60 min mit 10 mM Pyruvat und Phenacetin bzw. Paracetamol inkubiert.

- | | | |
|-------------|---|--|
| Paracetamol | Δ | Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen mit je 3 Wiederholungen |
| Phenacetin | ● | Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen mit je 3 Wiederholungen |
| | × | Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen mit je 3 Wiederholungen |
| | ± | mittlerer Fehler des Mittelwerts. |

6. Wirkung des Cyanid

Die Hemmwirkung von Cyanid auf die Glukosebildung der Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat ist in Abbildung 8 dargestellt. Schon bei einer Cyanidkonzentration von 50 μM ist während einer Inkubationszeit von 60 min eine deutliche Hemmung der Glukosebildung zu beobachten. 100 μM Cyanid hemmen die Glukosebildung zu etwa 25 %, 250 μM zu etwa 70 % und 500 μM zu etwa 90 %. Ab etwa 750 μM Cyanid wird die Glukoneogenese isolierter Nierentubuli vollständig gehemmt. Eine 50 %-ige Hemmung wird durch etwa 175 μM Cyanid erreicht.

7. Wirkung der Alkylphosphate

a) Wirkung des Tabun

(Dimethylamido-cyan-phosphorsäureäthylester)

Der Cholinesterasehemmer Tabun hat eine etwa gleich starke Hemmwirkung auf die Glukosebildung isolierter Nierentubuli wie Cyanid. Die Ergebnisse der Versuche mit Tabun sind in Abbildung 8 wiedergegeben. Der gegenüber der Kurve für Cyanid niedrigere Kontrollwert ohne die untersuchte Substanz ist dadurch bedingt, daß in allen Versuchsansätzen mit Tabun 1 % Isopropanol enthalten war, da die Stammlösungen des Tabun wegen der besseren Haltbarkeit in Isopropanol verdünnt wurden. Durch 30 μM Tabun ist die Glukosebildung aus 10 mM Pyruvat während einer Inkubationszeit von 60 min schon deutlich gehemmt. 67 μM Tabun im Versuchsansatz senken die Glukosebildung um etwa 20 %, 334 μM Tabun zu etwa 70 % und 668 μM zu etwa 90 %. Ab etwa 1000 μM wird die Glukosebildung vollständig gehemmt. Eine 50 %-ige Hemmung erfolgt durch etwa 200 μM Tabun.

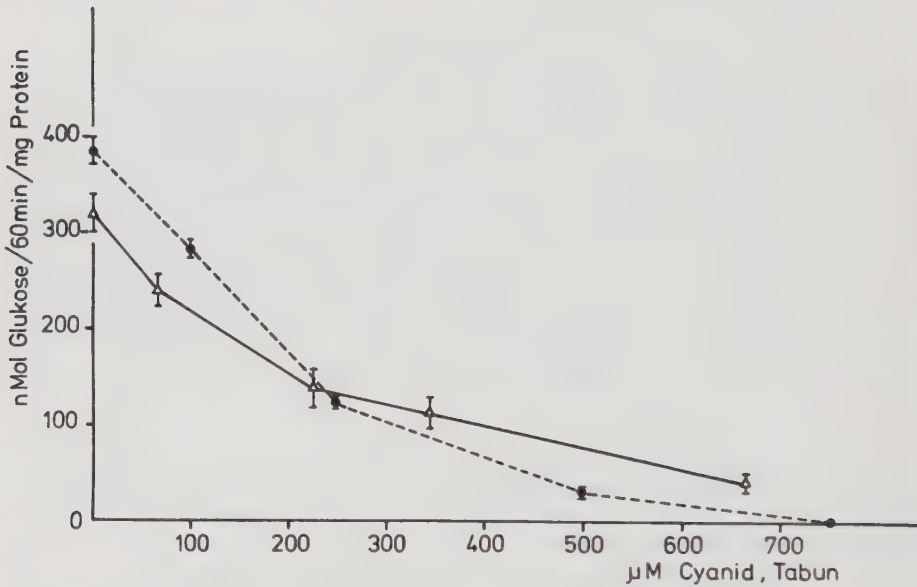


Abb.8:

Einfluß von Tabun und Cyanid auf die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung ist in Abhängigkeit von der Konzentration der beiden Substanzen im Inkubationsansatz aufgetragen. Die Nierentubuli wurden 60 min mit 10 mM Pyruvat und Tabun bzw. Cyanid inkubiert.

Tabun Δ Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen mit je 3 Wiederholungen

Cyanid $\bullet$ Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen mit je 3 Wiederholungen

$\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwerts

b) Wirkung des Sarin

(Methylphosphonsäure-fluor-isopropylester)

Sarin ist wie Tabun ein Cholinesterasehemmer. Seine Hemmwirkung auf die Glukoneogenese der Nierentubuli ist geringer als die von Tabun (Abbildung 9). Während einer Inkubationszeit von 60 min wird die Glukosebildung aus 10 mM Pyruvat durch eine Konzentration von 0,8 mM Sarin erst zu etwa 45 % gehemmt. Dagegen hemmt eine gleich hohe Konzentration an Tabun schon zu über 90 %. 1,5 mM Sarin hemmen zu etwa 60 %, 2,3 mM zu etwa 65 %, 4 mM zu etwa 80 % und 8 mM zu etwa 90 %. Eine 50 %-ige Hemmung erfolgt durch etwa 1 mM Sarin.

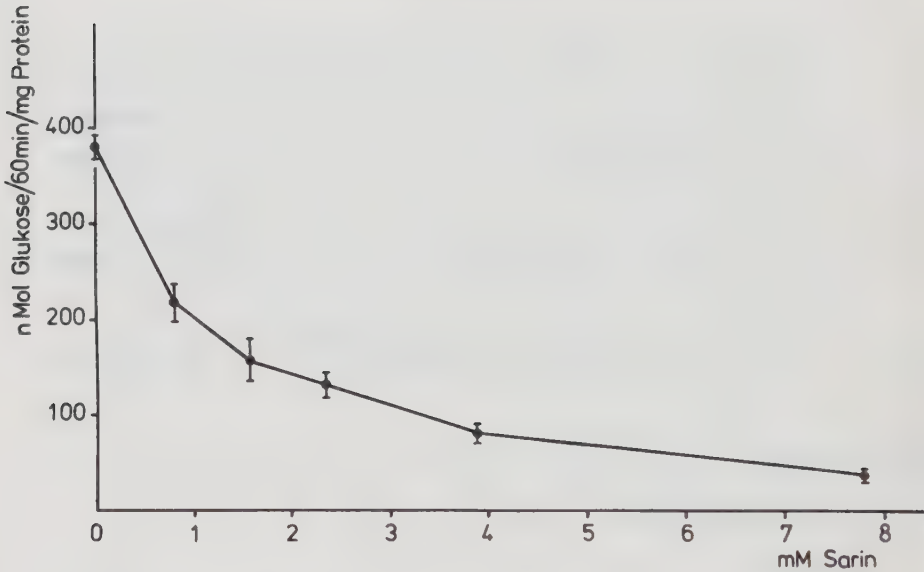


Abb.9:

Einfluß von Sarin auf die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung ist in Abhängigkeit von der Sarinkonzentration im Inkubationsansatz aufgetragen. Die Marken sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen mit je drei Wiederholungen. Die Nierentubuli wurden 60 min mit 10 mM Pyruvat und Sarin inkubiert.

$\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwerts

IV. DISKUSSION

=====

Die Glukoneogenese kann sowohl in der Leber als auch in der Niere nachgewiesen werden. Zum Studium der Glukoneogenese der Niere sind isolierte Nierentubuli gut geeignet, wie die Arbeiten von GUDER et al. zeigen. Gegenüber Nierenrindenschnitten haben sie den Vorteil, daß sie als Suspensionen pipettierbar sind und deshalb die Durchführung größerer Versuchsserien mit einem gleichen Gehalt an Nierenzellen ermöglichen.

Die Glukoneogenese ist ein biosynthetischer energieverbrauchender Prozeß, der von der oxydativen Phosphorylierung der Atmungskette abhängt.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Substrat für die Glukoneogenese Pyruvat verwendet, mit dem die höchsten Glukosekonzentrationen erreicht werden. An der Biosynthese von 1 Mol Glukose aus 2 Mol Pyruvat sind viele Enzyme beteiligt. Hierfür werden mindestens 6 Mol ATP als chemische Energiequelle benötigt, die während des Abbaus eines Teils des Substrats von der Atmungskette bereitgestellt werden. Wegen des hohen Energiebedarfs der Glukoneogenese wirken sich Änderungen in der Energiesituation der Zelle stark auf die Glukosebildung aus. Deshalb führt eine Hemmung oder Entkoppelung der Atmungskette zu einer Verminderung der Glukosebildung.

Andererseits kann die Glukosebildung durch Hemmung anderer energieverbrauchender Stoffwechselvorgänge der Zelle gesteigert werden. FRIEDRICHS u. SCHONER (1973) beobachteten eine Stimulierung der Glukoneogenese an isolierten Nierentubuli und an Nierenrindenschnitten durch Strophanthin und die Diuretika Etacrynsäure und Furosemid. Sie führen die Steigerung der Glukosebildung auf eine Hemmung der Natriumpumpe der Nierenzellen zurück, wodurch der Energiebedarf der Zellen um etwa 30 - 40 % gesenkt wird. Hierdurch wird in der Zelle ein höheres Energieniveau erreicht, welches energieverbrauchende synthetische Prozesse begünstigt.

Durch cyclisches Adenosin-Monophosphat wird ab einer Konzentration von etwa $10 \mu\text{M}$ die Glukosebildung aus Substraten, welche auf ihrem Weg zur Glukose die Phosphopyruvat-Carboxylase passieren, gesteigert. Durch Nucleotidkonzentrationen von über 1 mM wird die Glukosebildung aus Pyruvat und Lactat gehemmt (GUDER, WIESNER, STUKOWSKI u. WIELAND, 1971). Durch Parathormon und freie Fettsäuren wird die Glukoneogenese ebenfalls gesteigert (GUDER u. WIELAND, 1972).

Cyanid blockiert durch Hemmung der Cytochromoxydase die Atmungskette. Die Sauerstoffaufnahme von Rattennierenschnitten wird durch $400 \mu\text{M}$ Cyanid zu 63 % und durch 2 mM Cyanid zu 89 % gehemmt (ALT 1930). Verglichen hiermit wird die Glukoneogenese isolierter Nierentubuli in etwas niedrigerer Konzentration des Giftes gehemmt: $175 \mu\text{M}$ Cyanid hemmen zu etwa 50 %; ab etwa $750 \mu\text{M}$ Cyanid kommt es zu vollständiger Hemmung der Glukoneogenese isolierter Nierentubuli. Dies könnte daran liegen, daß schon bei einer teilweisen Hemmung der Atmungskette

nicht mehr genug ATP für die Synthese der Glukose bereitgestellt wird.

Die tödliche Cyaniddosis beträgt bei der Ratte $120 \mu\text{Mol/kg}$ (DL_{50} 7,8 mg KCN/kg s.c. DAVID, 1967). In der gleichen Größenordnung liegen die in vitro ermittelten Konzentrationen für Cyanid, welche die Glukosebildung isolierter Nierentubuli hemmen.

Die Glukosebildung isolierter Nierentubuli wird durch Tabun wesentlich stärker gehemmt, als durch das als Cholinesterasehemmer wirksamere Sarin (50 %-ige Hemmung durch $200 \mu\text{M}$ Tabun bzw. 1 mM Sarin).

Durch Tabun und Cyanid wird die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus Pyruvat etwa gleich stark gehemmt. Dies spricht dafür, daß die Hemmung der Glukosebildung durch Tabun der im Tabun enthaltenen Cyanidgruppe zuzuschreiben ist, die hydrolytisch abgespalten werden kann.

Die beobachteten Hemmwirkungen haben wahrscheinlich in vivo keine Bedeutung, da schon $3 \mu\text{Mol}$ Sarin/kg und $3,8 \mu\text{Mol}$ Tabun/kg tödlich wirken (DL_{50} Maus i.p. HOLMSTEDT, 1963). Dennoch beobachteten DOMSCHKE u. DOMSCHKE (1972) an Ratten nach Verabreichung von Alkylphosphaten (DFP und Soman) eine vorübergehende Senkung der Glukoneogenese und Harnstoffbildung der Leber, verbunden mit einer Verschiebung des Redoxgleichgewichtes der Zelle zum reduzierten Zustand hin und ATP-Abfall. Da sich diese Effekte an Atropin-vorbehandelten Ratten nur in abgeschwächter Form zeigten, sehen sie die Wirkung der Alkylphosphate auf die Leberzellen

als indirekt an und beziehen diese auf Hypoxie und Ischämie infolge der unter der Alkylphosphatvergiftung eintretenden Anhäufung von Acetylcholin in der Leber.

Phenacetin und Paracetamol sind häufig verwendete Analgetika und Antipyretika. Beim Menschen treten nach Einnahme von mehr als 10 g Paracetamol (60 mMol) schwere centrilobuläre Lebernekrosen und Nierentubulienekrosen auf. (BOYER u. ROUFF, 1971; PRESCOTT, WRIGHT, ROSCOE u. BROWN, 1971). Nach Einnahme von etwa 30 g Paracetamol wurden Todesfälle beobachtet (PRESCOTT, 1972). Dagegen wurde die Einnahme von etwa 50 g Phenacetin überlebt (THÖLEN, VÖGTLI, RENSCHLER u. SCHAEFFER 1956, MOESCHLIN 1957).

Die in den letzten 20 Jahren häufiger auftretende chronisch-interstitielle Nephritis wird auf einen jahrelangen Phenacetinmißbrauch zurückgeführt (ZOLLINGER 1955, MÖSCHLIN 1957, GLOOR 1962, RAAFLAUB u. DUBACH 1972). Andere Autoren bezweifeln dies, da meist Kombinationspräparate verschiedener Analgetika verwendet werden (SHELLEY 1967, ABEL 1971). Im Tierversuch hat sich bisher durch Phenacetin keine chronisch-interstitielle Nephritis erzeugen lassen. PETERS et al. (1972) fanden nach bis zu 60-tägiger Verabreichung subletaler Dosen von Phenacetin und Paracetamol an Ratten neben Lebernekrosen auch Schädigungen der Nierenrinde in Form von vacuoliger Degeneration, Hämosiderinablagerungen und fokalen Nekrosen. Sie fanden jedoch keine interstitielle Nephritis und keine Papillennekrosen. Nach einmaliger intravenöser Injektion von 2 mMol Paracetamol/kg

treten bei der Ratte keine Nierenschäden auf. Dagegen wurden nach Injektion von 4 mMol Aceto-Salicylsäure/kg Nekrosen der proximalen Tubuli contorti der Nierenrinde nachgewiesen (CALDER, FUNDER, GREEN, HAM u. TANGE, 1971).

Phenacetin wird im Nierenmark angereichert. BARRACLOUGH u. NILAM (1972) fanden bei antidiuretisch behandelten Hunden nach Gabe von 0,39 - 0,56 mMol/kg Phenacetin (70 - 100 mg/kg) in der Nierenrinde 0,56 - 0,73 mM und in der Nierenpapille 1,6 - 4 mM Phenacetin. SOLISCH (1963) beobachtete beim Menschen Phenacetinkonglomerate in den Nierenkelchen.

Die tödlichen Dosen (DL_{50} p.o.) an Phenacetin und Paracetamol betragen bei der Ratte 9,2 mMol Phenacetin pro kg (1,65 g/kg) und 24,5 mMol Paracetamol pro kg (3,71 g/kg) (BOYD u. BERECZKY, 1966, BOYD u. SHEPPARD, 1966). Konzentrationen an Phenacetin und Paracetamol, welche in vitro den Zellstoffwechsel hemmen liegen in der gleichen Größenordnung: Die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus Pyruvat wird durch 3,2 mM Phenacetin und durch 9 mM Paracetamol zu etwa 50 % gehemmt. STAUB (1958) gibt für Rattennierenschnitte vergleichbare Ergebnisse an: Durch 1,3 - 13 mM Paracetamol wird die Sauerstoffaufnahme um 4 - 21 % und die Phenolrotaufnahme um 22 - 30 % gesenkt; durch 0,13 - 1,3 mM Phenacetin wird die Sauerstoffaufnahme um 5 - 20 % und die Phenolrotaufnahme um 6 - 44 % gesenkt.

Mit Amidopyrin werden gleichartige Wirkungen in wesentlich geringeren Konzentrationen ($44 \mu\text{M}$) erzielt. MANDEWIRTH (1933) beobachtete eine Senkung der Sauerstoffaufnahme von Skelet- und Herzmuskulatur durch Antipyrin, Chinin, Phenacetin und Salicylate in Konzentrationen von 10^{-5} - 10^{-2} M. Durch 2 mM Acetylsalicylsäure wird die Atmungskette zu 72 % entkoppelt, während Phenacetin keine derartige Wirkung hat (BRODY, 1956).

Wie diese Beispiele zeigen, stören verschiedene Analgetika den Energiestoffwechsel der Nierenzelle in hohen Konzentrationen. Diese Stoffwechselwirkungen können bei der akuten Vergiftung mit diesen Substanzen von Bedeutung sein.

Es ist fraglich, ob die beschriebenen nephrotoxischen Wirkungen zu einer chronisch-interstitiellen Nephritis führen können, da sich bisher im Tierversuch keine interstitielle Nephritis hat erzeugen lassen. Wenn Phenacetin wirklich allein zu einer chronisch-interstitiellen Nephritis führt, so muß es in einer von anderen Analgetika abweichenden Weise auf die Niere wirken. Ein derartig abweichendes Verhalten ließ sich jedoch mit den oben beschriebenen Versuchen nicht erfassen.

Vielleicht wird der Stoffwechsel isolierter Nierentubuli durch die kovalente Bindung von Metaboliten des Phenacetin und Paracetamol an die Zellstruktur gestört, wie sie in vivo und in vitro beobachtet wurde (MITCHELL et al. 1972, POTTER et al. 1972, NERY 1971). Die N-Hydroxylierung, die bei dieser Reaktion eine Rolle

spielt, wurde auch in der Niere nachgewiesen (UEHLEKE u. SCHNITGER, 1969). Dabei entstehen Derivate des Phenylhydroxylamins, die sehr reaktionsfähig sind: Die Sauerstoffaufnahme von Nierenrindenschnitten wird durch $10\text{ }\mu\text{M}$ Phenylhydroxylamin innerhalb von 90 min vollständig gehemmt (ALSLEV, KIESE, 1951). Bei Ratten treten nach Injektion von $1,4\text{ mMol}$ Phenylhydroxylamin pro kg Nierentubulinekreben auf (CALDER, FUNDER, GREEN, HAM, TANGE, 1971).

Die tödlichen Dosen von 4-Dimethylaminophenol und 4-Aminophenol betragen bei der Ratte $0,52\text{ mMol}$ 4-DMAP/kg (DL_{50} 90 mg 4-Dimethylaminophenol-Hydrochlorid/kg i.p. N.WEGER, pers.Mitt.) und $4,4\text{ mMol}$ 4-AP/kg (LD 640 mg 4-Aminophenol-Hydrochlorid/kg i.p. LESTER, GREENBERG, SHUKOVSKY, 1944). Nach einmaliger intravenöser Gabe von $0,58\text{ mMol}$ 4-Dimethylaminophenol pro kg (KIESE, SCINICZ, WEGER, THIEL, 1974 in Vorber.) oder von $0,1 - 2,8\text{ mMol}$ 4-Aminophenol pro kg (CALDER, FUNDER, GREEN, HAM, TANGE, 1971) treten bei Ratten isolierte Nekrosen der proximalen Tubuli contorti der Nieren auf. Die hier angewandte Dosis für 4-Dimethylaminophenol liegt weit über der zur Behandlung einer Cyanidvergiftung erforderlichen Dosis, die beim Menschen etwa $3,25\text{ mg/kg}$ 4-Dimethylaminophenol-Hydrochlorid ($18,7\text{ }\mu\text{Mol/kg}$) beträgt (KIESE u. WEGER, 1969). Bei den hier beschriebenen Versuchen mit isolierten Nierentubuli wurde die Glukosebildung durch $20\text{ }\mu\text{M}$ 4-Dimethylaminophenol und $350\text{ }\mu\text{M}$ 4-Aminophenol zu etwa 50 % gehemmt. Diese Konzentrationen gelten für einen Tubuliproteingehalt von 1 mg Protein/ml . (Das entspricht einem Gewebefeuchtgewichtgehalt von $6,4\text{ mg/ml}$.) Bei Versuchen mit verschiedenem Gehalt an Nierentubuli

zeigte sich, daß zur Erzielung einer bestimmten Hemmwirkung auf die Glukosebildung ein konstantes Verhältnis zwischen der Konzentration der beiden Substanzen und der Konzentration an Nierentubuli bestehen muß. Dies deutet darauf hin, daß die beiden Substanzen entweder stark an die Nierentubuli gebunden werden oder daß sie chemisch mit ihnen in einer anderen Weise reagieren. Bezieht man deshalb die hemmenden Dosen auf das im Inkubat enthaltene Nierengewebe, so ergibt sich, daß die Glukosebildung von 1 kg Nierentubuli durch 3,1 mMol 4-Dimethylaminophenol oder 55 mMol 4-Aminophenol zu 50 % gehemmt wird.

Die Wirkungsweise von 4-Dimethylaminophenol und 4-Aminophenol hängt wohl mit der Instabilität der beiden Substanzen und ihrer oxydierenden Wirkung zusammen. 4-Dimethylaminophenol zerfällt in wässrigen Lösungen bei 37°C und pH 7,4 unter Sauerstoffeinwirkung innerhalb von etwa 2 Stunden in Dimethylamin, Hydrochinon, Formaldehyd und andere Verbindungen (EYER, KIESE, LIPOWSKY, WEGER, 1973).

Der zeitliche Ablauf der Glukosebildung isolierter Nierentubuli in Anwesenheit der beiden Substanzen spricht dafür, daß Zerfallsprodukte an der Hemmwirkung beteiligt sind. Hierdurch läßt sich die im Laufe der Inkubation zunehmende Hemmwirkung erklären.

Durch Zugabe von reduziertem Glutathion zum Versuchsansatz läßt sich die Hemmwirkung von 4-Dimethylaminophenol und von 4-Aminophenol auf die Glukoneogenese der Nierentubuli wesentlich verringern. Dies läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß beide Substanzen

mit aktiven Zentren von Enzymen reagieren. Durch das Reduktionsmittel Glutathion könnten die Enzyme vor der Oxydation geschützt werden. Im lebenden Organismus wird Glutathion eine derartige Schutzwirkung gegen elektrophile Angriffe auf die Zelle zugeschrieben (JOLLOW, POTTER, HASHIMOTO, DAVIS, MITCHELL, 1972).

In Tabelle 5 sind die tödlichen Dosen der untersuchten Pharmaka wiedergegeben. Die niedrigsten tödlichen Dosen haben die Alkylphosphate Tabun und Sarin. Die höchsten tödlichen Dosen haben Phenacetin und Paracetamol. Dazwischen liegen die tödlichen Dosen von Cyanid, 4-Dimethylaminophenol und 4-Aminophenol.

Ordnet man die untersuchten Substanzen nach ihrer Hemmwirkung auf die Glukoneogenese (Abbildung 10, Tab.5) so ergibt sich eine andere Reihenfolge. In der niedrigsten Konzentration hemmt 4-Dimethylaminophenol die Glukosebildung aus Pyruvat, dann folgen Cyanid, Tabun und 4-Aminophenol und in den höchsten Konzentrationen hemmen Sarin, Phenacetin und Paracetamol.

Vergleicht man die beiden Reihen von tödlichen Dosen und Hemmwirkungen auf die Glukoneogenese, so zeigt sich, daß Phenacetin und Paracetamol am Ende beider Reihen stehen. Auch Cyanid liegt in beiden Reihen etwa an gleicher Stelle. Abweichungen ergeben sich bei den beiden Alkylphosphaten und den beiden Ferrihämoglobinbildnern. Sarin hat die niedrigste tödliche Dosis, es hemmt jedoch die Glukosebildung von Nierentubuli erst in relativ hohen Konzentrationen. Dieses unterschiedliche Verhalten läßt sich damit erklären, daß Sarin vor allem als Cholinesterasehemmer wirkt.

4-Dimethylaminophenol hemmt von den untersuchten Substanzen die Glukoneogenese in der niedrigsten Konzentration, während es in der Reihe der tödlichen Dosen erst an 4. Stelle steht. Bei dieser starken Hemmwirkung des 4-Dimethylaminophenol an isolierten Nierentubuli liegt die Vermutung nahe, daß in vivo bei der Entstehung von Nekrosen der proximalen Tubuli contorti der Niere nach Injektion von hohen Dosen 4-Dimethylaminophenol gleichartige Wirkungen eine Rolle spielen.

Pharmakon	tödliche Dosis (Ratte, Maus)	therapeut. Dosis(Mensch)	50% Hemmung der Gluko- neogenese
Sarin	3 μ Mol/kg (1)		1 mM
Tabun	3,8 μ Mol/kg (1)		200 μ M
KCN	120 μ Mol/kg (2)		175 μ M
4-DMAP (3)	520 μ Mol/kg (3)	18,7 μ Mol/kg(6)	20 μ M
4-AP (4)	4,4mMol/kg (4)		350 μ M
Phenacetin	9,2mMol/kg (5)	ca.50 μ Mol/kg	3,2 mM
Paracetamol	24,5mMol/kg (5)	ca.50 μ Mol/kg	9 mM

Tab.5: Toxizität der untersuchten Pharmaka

Anmerkungen:

- (1) Maus DL₅₀ i.p. HOLMSTEDT 1963
- (2) Ratte DL₅₀ i.p. DAVID 1967
- (3) 4-Dimethylaminophenol Ratte DL₅₀ i.p.
N.WEGER pers.Mitt.
- (4) 4-Aminophenol Ratte LD i.p. LESTER, GREENBERG
u. SHUKOVSKY 1944
- (5) Ratte DL₅₀ p.o. BOYD u. BERECHZKY 1966
BOYD u. SHEPPARD 1966
- (6) KIESE u. WEGER 1969

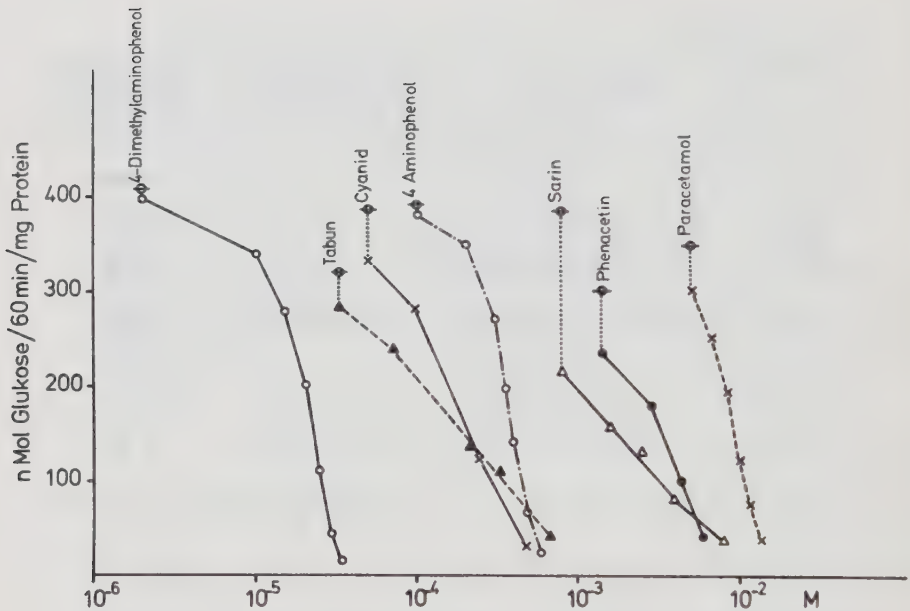


Abb. 10:

Zusammenfassende Darstellung der Hemmwirkungen aller untersuchten Substanzen auf die Glukosebildung in isolierten Rattennierentubuli aus Pyruvat.

Die Glukosebildung der Nierentubuli ist in Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Substanzen im Inkubationsansatz aufgetragen. Die molaren Konzentrationen der untersuchten Substanzen sind auf der Abszisse in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Inkubationszeit der Nierentubuli mit der untersuchten Substanz und 10 mM Pyruvat: 4-Dimethylaminophenol: 80 min, alle anderen Substanzen: 60 min.

⊖ Glukosebildung ohne untersuchte Substanz

V. Z U S A M M E N F A S S U N G
=====

Isolierte Nierentubuli, die mit Kollagenase aus der Nierenrinde hungernder Ratten präpariert wurden, bilden wie die Niere aus Lactat, Pyruvat, Aminosäuren und Zwischenprodukten des Citratzyklus Glukose. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluß verschiedene nierenschädigende Substanzen und Alkylphosphate auf die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus Pyruvat haben. Dabei ergab sich:

- 1) Während einer Inkubationszeit von 60 min (bzw. 80 min mit 4-Dimethylaminophenol) mit den untersuchten Substanzen wird die Glukosebildung isolierter Nierentubuli aus 10 mM Pyruvat gegenüber der Kontrolle durch die untersuchten Substanzen in folgenden Konzentrationen um 50 % gesenkt durch:

20 μ M 4-Dimethylaminophenol
(bei 1 mg Protein/ml Inkubat)

175 μ M Cyanid

200 μ M Tabun

350 μ M 4-Aminophenol (bei 1 mg Protein/ml
Inkubat)

1 mM Sarin

3,2 mM Phenacetin

9 mM Paracetamol.

Durch alle Substanzen ließ sich die Glukosebildung vollständig hemmen.

- 2) Die Hemmwirkung von 4-Dimethylaminophenol und von 4-Aminophenol auf die Glukosebildung hängt vom Gehalt des Inkubats an Nierentubuli ab. Gleich starke Hemmung ergibt sich bei einem konstanten Verhältnis von Konzentration des Pharmakon und Nierentubuligehalt (Dosis/mg Protein). Dies spricht dafür, daß die beiden Substanzen stark an die Nierentubuli gebunden werden oder chemisch mit ihnen reagieren.
- 3) Die Glukosebildung aus 10 mM Pyruvat ist bis zu einer Inkubationszeit von 80 min annähernd konstant. In Gegenwart von 4-Dimethylaminophenol bzw. 4-Aminophenol fällt die Geschwindigkeit der Glukosebildung während dieser Inkubationszeit stark ab. Dies spricht dafür, daß die hemmenden Substanzen erst während des Zerfalls der Ausgangssubstanz entstehen.
- 4) Die Hemmwirkung von 4-Dimethylaminophenol und 4-Aminophenol läßt sich durch Zugabe von reduziertem Glutathion zur Inkubationslösung verringern. Dies könnte darauf beruhen, daß reduziertess Glutathion als Reduktionsmittel aktive Zentren von Enzymen vor der Oxydation durch die beiden Substanzen schützt.

VI. L I T E R A T U R A N G A B E N

=====

ABEL, J.A. (1971)

Analgesic nephropathy - A review of the
literature, 1967 - 1970
Clin. Pharmacol. Ther. 12, 583 (1971)

ALSLEV, J. u. KIESE, M. (1951)

Die Wirkung von Phenylhydroxylamin und
Nitrobenzol auf den Sauerstoffverbrauch
von Gewebeschnitten und Gewebsbrei
Arch.exp.Path.Pharmakol. 213, 249 (1951)

ALT, H.L. (1930)

Über die Atmungshemmung durch Blausäure
Biochem.Z. 221, 489 (1930)

BARRACLOUGH, M.A. u. NILAM, F. (1972)

Effect of vaspressin on the renal tubular
reabsorption and cortico-papillary concen-
tration gradient of phenacetin and its
metabolites
Experienta 28, 1065 (1972)

BERGMEYER, U. (1970)

Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag
Chemie Weinheim/Bergstr. (1970) S.1163

BOYD, E.M. u. BERECZKY, G.M. (1966)

Liver necrosis from paracetamol
Brit.J.Pharmacol. 26, 606 (1966)

- BOYD, E.M. u. SHEPPARD, E.P. (1966)
Dose-response changes in organ weights and
in water contents following administration
of toxic doses of paracetamol
Brit.J.Pharmacol. 27, 497 (1966)
- BOYER, T.D. u. ROUFF, S.L. (1971)
Acetaminophen-induced hepatic necrosis and
renal failure
JAMA 218, 440 (1971)
- BRODY, T.M. (1956)
Action of sodium salicylate and related
compounds on tissue metabolism in vitro
J.Pharmacol. and exp. Ther. 117, 39 (1956)
- CALDER, I.C., FUNDER, C.C., GREEN, C.R., HAM, K.N.
u. TANGE, J.D. (1971)
Comparative nephrotoxicity of aspirin and
phenacetin derivatives
Brit.Med.J. 4, 518 (1971)
- DAVID, D. (1967)
Rolle des Hydroxocobalamins bei der Thera-
pie und Prophylaxe der Cyanidvergiftungen
(ungarisch)
Honvedorvos 19, 147 (1967)
- DIXON, M.F., NIMMO, J. u. PRESCOTT, L.F. (1971)
Experimental paracetamol-induced hepatic
necrosis: a histopathological study
J.Pathol. 103, 225 (1971)

DOMSCHKE, S. u. W. (1972)

Der Einfluß von Alkylphosphaten auf die Netto-
produktion von Glukose und Harnstoff in der
isoliert perfundierten Rattenleber
Arch. Toxikol. 29, 143 (1972)

EYER, P., KIESE, M. u. WEGER, N. (1973)

The reaction of 4-dimethylaminophenol with
hemoglobin
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 227
Suppl. R 16 (1973)

EYER, P., KIESE, M., LIPOWSKY, G. u. WEGER, N. (1973)

Reactions of 4-dimethylaminophenol with
hemoglobin and autoxidation of 4-dimethyl-
aminophenol
Chem.-Biol. Interactions, 8 (1973)

FRIEDRICH, D. u. SCHONER, W. (1973)

Stimulation of renal gluconeogenesis by
inhibition of the sodium pump
Biochim.Biophys. Acta 304, 142 (1973)

GLOOR, F. (1962)

Phenacetinabusus und Nierenschädigung
Schweiz.Med.Wschr. 92, 61 (1962)

GUDER, W. u. WIELAND, O. (1971)

in H.D. Söling und B. Willms

Regulation der Glukoneogenese S. 226
Thieme Verlag Stuttgart 1971

GUDER, W., WIESNER, W., STUKOWSKI, B. u. WIELAND, O.
(1971)

Metabolism of isolated kidney tubules
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 352, 1319
(1971)

GUDER, W., STUKOWSKI, B., WIESNER, W. u. WIELAND, O.
(1972)

Metabolism of isolated kidney tubules
in M. Hohenegger, Biochemische Aspekte der
Nierenfunktion, Goldmann Verlag München 1972

GUDER, W.G. u. WIELAND, O.H. (1972)

Metabolism of isolated kidney tubules.
Additive effects of parathyroid hormone
and free-fatty acids on renal gluconeogenesis.
Eur.J.Biochem. 31, 69 (1972)

HOLMSTEDT, B. (1963)

Kapitel 9 in Koelle, G.B., Handbuch der experi-
mentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk Band 15.
Cholinesterases and anticholinesterase agents
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidel-
berg 1963

JOLLOW, D., POTTER, W.Z., HASHIMOTO, M., DAVIS, D.C.
u. MITCHELL, J.R. (1972)

Acetaminophen-induced hepatic necrosis,
role of glutathione
Federat.Proc. 31, 539 Abs. 1835 (1972)

KIESE, M. u. WEGER, N. (1969)

Formation of ferrihaemoglobin with amino-
phenols in the human for the treatment of
cyanide poisoning
Europ.J.Pharmacol. 7, 97 (1969)

KIESE, M., SCINICZ, L., THIEL, N. u. WEGER, N.
(1974 in Vorber.)

Wirkung des 4-Dimethylaminophenols und
4-Aminophenols auf Organe von Hunden
und Ratten

KOELLE, G.B. (1963)

Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Ergänzungswerk Band 15 Cholinesterases and
anticholinesterase agents
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidel-
berg 1963

KREBS, H.A. u. HENSELEIT, K. (1932)

Untersuchungen über die Harnstoffbildung
im Tierkörper
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 210, 33 (1932)

KREBS, H.A., BENNETT, D.A.H., de GASQUET, P.,
GASCOYNE, T. u. YOSHIDA, T. (1963)

Renal gluconeogenesis
Biochem.J. 86, 22 (1963)

LESTER, D., LEON, A., GREENBERG, A. u. SHUKOVSKY, E.
(1944)

Formation of methemoglobin

IV Limited importance of methemoglobinemia
in the toxicity of certain aniline derivatives
J. Pharmacol. 80, 78 (1944)

MANDEWIRTH, P. (1933)

Über die Wirkung einiger Antipyretika auf
die Sauerstoffzehrung
Inaugural-Dissertation, Münster 1933

MITCHELL, J.R., POTTER, W.Z., JOLLOW, D., DAVIS, D.C.,
GILLETTE, J.R. u. BRODIE, B.B. (1972)

Acetaminophen-induced hepatic necrosis,
potentiation by inducers and protection
by inhibitors of drug-metabolizing enzymes
Federat.Proc. 31, 539 Abs, 1832 (1972)

MOESCHLIN, S. (1957)

Phenacetinsucht und -schäden
Schweiz.Med.Wschr. 87, 123 (1957)

NERY, R. (1971)

The binding of radioactive label from
labelled phenacetin and related compounds
to rat tissue in vivo and to nucleic acids
and bovine plasma albumin in vitro
Biochem.J. 122, 311 (1971)

PETERS, G., BAECHTOLD-FOWLER, N., BONJOUR, J.Ph.,
CHOMETY-DIEZI, F., FILLOUX, B., GUIDOUX, R.,
GUIGNARD, J.P., PETERS-HAEFELI, L., ROCH-RAMEL, F.,
SCHELLING, J.L., HEDINGER, C.u. WEBER, E. (1972)

General and renal toxicity of phenacetin,
paracetamol and some anti-mitotic agents
in the rat.

Arch.Toxikol. 28, 225 (1972)

POTTER, W.Z., DAVIS, D.C., JOLLOU, D. u. MITCHELL,
J.R. (1972)

Acetaminophen-induced hepatic necrosis,
conditions for covalent binding of acetamino-
phen to hepatic macromolecules

Federat.Proc. 31, 539 Abs, 1833 (1972)

PRESCOTT, L.F., WRIGHT, N., ROSCOE, P. u. BROWN, S.S.
(1971)

Plasma-paracetamol half-life and hepatic
necrosis in patients with paracetamol
overdosage

Lancet 1971, 1, 519

PRESCOTT, L.F. (1972)

Antipyretic analgesics and drugs used in
rheumatic diseases and gout.

Chapter 9 in L.Meyler u. A. Herxheimer.

Side effects of drugs, Vol.7, Excerpta

Medica, Amsterdam 1972

RAAFLAUB, J. u. DUBACH, U.C. (1972)

Zur Frage der Pathogenese der chronisch-
interstitiellen Nephritis nach protrahiertem
Schmerzmittelabusus

Klin.Wschr. 55, 489 (1972)

SHELLEY, J.H. (1967)

Phenacetin, through the looking glass
Clin.Pharmacol. Ther. 8, 427, (1967)

SOLISCH, P. (1963)

Phenacetinkonkrementbildung und chronisch
interstitielle Nephritis bei Phenacetin-
abusus

Zbl.allg.Path. Path.Anat. 105, 379 (1963)

STADE, K. (1964)

Pharmakologie und Klinik synthetischer
Gifte

Deutscher Militärverlag, Berlin 1964

STAUB, H. (1958)

Diskussionsbeitrag S.47 in Sarre, Moench,
Kluthe: Phenacetinabusus und Nierenschädigung,
Thieme Verlag, Stuttgart 1958

THÖLEN, H., VÖGTLI, J., RENSCHLER, H. u. SCHAEFFER, A.
(1956)

Beitrag zur Genese der interstitiellen
Nephritis

Schweiz.med.Wschr. 86, 946 und 978 (1956)

UEHLEKE, H. u. SCHNITGER, F. (1969)

Stoffwechsel von Phenacetin und p-

Phenenetidin in der Niere

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.

Pharmakol. 264, 319 (1969)

siehe auch ebenda 264, 434 (1969)

ZOLLINGER, H.U. (1955)

Chronische interstitielle Nephritis bei

Abusus von phenacetinhaltigen Analgetica

(Saridon usw.)

Schweiz.Med.Wschr. 85, 746 (1955)

LEBENS LAUF

Am 7. Dezember 1942 wurde ich, Wilhelm Schneiderhan in Hamburg als Sohn des Facharztes für Chirurgie Dr. Wilhelm Schneiderhan und seiner Ehefrau Margaretha, geb. Knüppel geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich in Laupheim, Kreis Biberach. Hier ging ich von 1949 bis 1953 in die Grundschule und anschließend von 1953 bis 1955 in das Progymnasium. 1955 übersiedelten meine Eltern nach Biberach a.d.Riß, wo mein Vater Chefarzt des Kreiskrankenhauses war. Ab 1955 besuchte ich das Wieland-Gymnasium in Biberach und legte dort 1962 die Reifeprüfung ab.

Von 1962 bis 1967 studierte ich an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München Medizin. Das medizinische Staatsexamen bestand ich am 7. Februar 1968.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich von 1968 bis 1970 am Kreiskrankenhaus in Biberach a.d.Riß ab. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 13. Mai 1970.

Zur Bundeswehr wurde ich 1970 eingezogen. Nach Ableistung meiner Wehrpflichtzeit verpflichtete ich mich 1972 als Berufssoldat.

Ich bin katholischen Bekenntnisses, seit 1972 verheiratet und habe 1 Kind und 3 Stiefkinder.

Von April 1972 bis Dezember 1973 arbeitete ich an der Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

